

552, 457

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
21 octobre 2004 (21.10.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/090128 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 11/04, C12G 1/022, 1/073, C12C 11/09

(74) Mandataire : PELAYO DE SOUSA HENRIQUES, Rui;  
Rua de Sá da Bandeira, 706-2º. Esqº., P-4000 Porto (PT).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/IB2003/001753

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 9 avril 2003 (09.04.2003)

(25) Langue de dépôt : portugais

(26) Langue de publication : français

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
PROENOL INDUSTRIA BIOTECNOLOGICA, LDA  
[PT/PT]; Travessa das Lages, 267, P-4405-194 Canelas  
VNG (PT).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : DE FATIMA TEIXEIRA CARDOSO DA SILVA, Maria [PT/PT]; Proenol Industria Biotechnologica, Lda, Travessa das Lages, 267, P-4405-194 Canelas VNG (PT). STREHAIANO, Pierre, Marie, Jean [FR/FR]; La Grande Borde, 43 Avenue de Cousse, F-31750 Escalquens (FR). CHEDAS SAMPAIO, Rui [PT/PT]; Rua Gil Vicente, Lote 7-2º. Dnº, P-2775 Parede (PT).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR IMMOBILISING MICROORGANISMS, RELATED MATERIAL, AND USE THEREOF

(54) Titre : PROCEDE D'IMMOBILISATION DE MICRO-ORGANISMES, PRODUIT CORRESPONDANT ET UTILISATION DE CELUI-CI

(57) Abstract: The present invention relates to a method for immobilising microorganisms (particularly yeasts or bacteria), a related material, and the use thereof in fermentation or bioconversion. Specifically, the present invention relates to the immobilisation of microorganisms in optionally dehydrated polymeric spheres consisting of two or more layers. The technical problem is that only part of the total microorganism population, namely the microorganisms adjacent to the edge of the sphere, is actually active in conventional spheres. According to the present invention, this problem is solved by providing a nutrient supply in the centre of the sphere and placing the microorganisms in a layer adjacent thereto, the resulting combination optionally being coated with a sterile layer defining, in this embodiment, a triple-layer sphere.

(57) Abrégé : Cette invention concerne un procédé d'immobilisation de micro-organismes (en particulier, levures ou bactéries), le respectif produit et son utilisation dans des opérations de fermentation ou de bioconversion. En particulier, cette invention concerne l'immobilisation de micro-organismes dans des sphères de polymères constituées par deux ou plusieurs couches, ces sphères étant susceptibles d'être déshydratées. Le problème technique est que dans les sphères traditionnelles seulement une partie de la population totale de micro-organismes est réellement en activité, il s'agit des micro-organismes se trouvant près de la périphérie des sphères. Selon l'invention ce problème est résolu grâce à la création d'une réserve nutritive dans le centre de la sphère et au placement des micro-organismes dans une couche contiguë à celle-ci, l'ensemble étant suivi éventuellement par le recouvrement au moyen d'une couche stérile qui définit, dans ce cas, une sphère à trois couches.



WO 2004/090128 A1

## DESCRIPTION

PROCEDE D'IMMOBILISATION DE MICRO-ORGANISMES, PRODUIT CORRESPONDANT ET UTILISATION DE CELUI-CI

### Champ d'application de l'invention

La présente invention propose un procédé nouveau et innovateur pour  
5 l'immobilisation de micro-organismes (en particulier, levures ou bactéries) le respectif produit et son utilisation dans des procédés de fermentation ou de bioconversion.

En particulier, cette invention concerne l'immobilisation de micro-  
10 organismes dans des sphères de polymères constituées par deux ou plusieurs couches, ces sphères étant susceptibles d'être déshydratées.

Ces sphères peuvent être utilisées dans l'élaboration de boissons fermentées, ou dans la réalisation de réactions de bioconversion. On appelle  
15 réactions de bioconversion aux transformations provoquées par les micro-organismes, mais qui ne nécessitent pas du développement de ces micro-organismes mêmes. Sont particulièrement visées les applications dans le domaine des boissons fermentées comme, notamment: les vins tranquilles, la bière, les vins mousseux, les boissons gazeuses, l'hydromel et l'alcool  
20 (éthylique).

### Arrière-plan technologique

Il est bien connu qu'il existe diverses façons d'immobiliser des micro-  
25 -organismes :

- 5 Des sphères homogènes, ou encore appelées « monocouche » ou « couche simple ». Elles sont constituées par un gel qui contient les micro-organismes, étant décrites dans les documents de brevet : FR2320 349 et FR2359202. Il est connu que ces sphères n'empêchent pas la sortie des micro-organismes (appelé relargage) vers le milieu de réaction, ce qui dans certains cas n'est pas compatible avec les exigences du procédé (vins mousseux par exemple, à cause du trouble indésirable que le relargage occasionne).
- 10
- 15 Le brevet EP0173915 décrit la réalisation d'une couche stérile autour du noyau de gel qui contient les micro-organismes, destinée à éviter ce phénomène de relargage, et développe l'application des sphères ou fils obtenus, appelés « double couche », dans les vins mousseux. Ce type de produit peut être humide ou partiellement déshydraté, comme expliqué au brevet EP0350374.

20 Le problème qui se pose actuellement est que, comme il est connu et prouvé, dans les sphères qui présentent une telle structure (mono-couche ou double-couche) seulement une petite fraction de la population totale de micro-organismes sont réellement en activité. En effet, les substrats nutritifs sont consommés par les micro-organismes situés dans la périphérie de la couche. D'autre part, pour certains cas, le milieu ne contient pas tous les

25 éléments nutritifs nécessaires à la bonne activité de ces micro-organismes immobilisés. Évidemment, ce problème est commun aux biocatalyseurs configurés sous d'autres formes, comme ceux présentés sous la forme de fils comme il est décrit dans le dit document EP0173915. Dans le cas des biocatalyseurs où les micro-organismes se trouvent immobilisés, ceux qui se

30 trouvent à la périphérie ou plus proche de celle-ci (dans le cas de l'existence d'une couche protectrice externe sans micro-organismes) consomment la plupart des éléments nutritifs qui viennent de l'extérieur, rendant impossible

ou diminuant l'accès aux micro-organismes situés plus vers l'intérieur ce qui fait que ces micro-organismes restent relativement inactifs.

### Description de l'invention

5

Malgré le fait que la description qui suit soit basée sur le cas d'un produit avec les micro-organismes immobilisés, dorénavant nommé biocatalyseur, se trouvant sous forme de sphères, cette forme étant utilisée à titre d'exemple, on peut matérialiser cette invention sous n'importe quelle  
10 autre forme, fils ou plaques, dès quelle soit compatible avec les principes généraux énoncés et avec le champ d'application défini dans les revendications.

Selon la présente invention, le problème énoncé précédemment est  
15 résolu au moyen de la création d'une réserve nutritive au centre de la sphère et du placement des micro-organismes dans une couche contiguë à celle-ci, l'ensemble étant suivi éventuellement par le recouvrement au moyen d'une couche stérile qui définit, dans ce cas, une sphère à trois couches.

De la même façon que ce qui est indiqué au-dessus pour le  
20 biocatalyseur, la description qui suit avec les 2 ou 3 couches est utilisée à titre d'exemple, constituant, en général, la forme préférée d'exécution, une fois qu'il peut se concevoir, selon le principe général de la présente invention, un biocatalyseur multi-couches, avec plus de couches, en alternant par  
25 exemple les couches de réserves nutritives, avec les couches qui contiennent les micro-organismes, l'ensemble étant éventuellement entouré par une couche stérile. Bien que les couches doivent être de préférence concentriques, cela n'est pas obligatoire.

De cette façon, la réserve nutritive peut être configurée comme un  
30 groupe d'endroits distincts entourés par la couche qui inclue les micro-organismes, l'ensemble pouvant être entouré par une couche stérile.

Selon une forme préférée d'exécution de l'invention, la couche externe stérile, quand elle existe, devra être exempte de micro-organismes et ne devra pas être perméable aux micro-organismes.

5

Selon une forme préférée d'exécution, l'objet de cette invention est une sphère à double ou triple couche avec les caractéristiques suivantes :

1. Une réserve nutritive qui a pour but de fournir aux micro-organismes immobilisés, dans la couche contiguë, les éléments nutritifs qui leur assurent une bonne activité mais dont le milieu où seront introduites les sphères n'est pas capable de fournir en quantité suffisante. Ces éléments nutritifs peuvent être légèrement différents en nature et en concentration selon la législation en vigueur dans les pays d'utilisation ; mais d'une façon générale ils fournissent une source d'azote (ammoniacal, aminé, selon le micro-organisme), des sels minéraux (phosphate, sulfates, potassium, magnésium, etc....) des oligo-éléments (fer, cuivre, zinc, etc....) et des vitamines (thiamine, biotine, etc....). Les extraits de levures autolysés seront avantageusement utilisés en tant que source nutritive.

Selon le type d'utilisation, cette réserve nutritive peut aussi contenir un substrat carboné comme un sucre fermentaire ou encore un milieu naturel complet comme un moût de raisin dilué ou pas.

Selon cette invention, cette solution nutritive est mélangée avec un polymère susceptible de se transformer en gel, par exemple un alginat de sodium. Une concentration adéquate de ce polymère se situe entre 1% et 3% en solution aqueuse.

2. Une couche contiguë à la réserve nutritive constituée d'une solution susceptible de se transformer en gel (dorénavant nommé milieu de fixation) et d'une population de micro-organismes en suspension dans cette solution. Les micro-organismes peuvent être, notamment, des levures ou des bactéries. Pour une application du type fermentation en bouteille de vin mousseux, ou de reprise de fermentation de moûts en arrêt de fermentation, il convient d'utiliser des souches sélectionnées de levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*.

Mis à part *Saccharomyces*, on peut aussi utiliser d'autres genres de levures, par exemple dans l'élaboration de bière, ou de boissons de faible teneur alcoolique ou encore dans les réactions de bioconversion. Par exemple, le genre *Schizosaccharomyces* sera plus utilisé pour la désacidification de moût de raisin acide ; les bactéries *Oenococcus oeni* ou *Lactobacillus* pour la fermentation malolactique et le genre *Candida* pour la bioconversion de xylose en xylitol.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la concentration du polymère varie entre 1% et 50%.

Les micro-organismes peuvent venir d'une culture fraîche réalisée selon les normes en vigueur à l'industrie ou bien d'une préparation commerciale sèche active ou lyophilisée et utilisée selon les conseils du fabricant.

3. Une couche externe additionnelle (dans le cas des sphères à 3 couches), qui est élaborée à partir d'un polymère de nature identique aux deux autres couches et susceptible de se transformer en gel. La concentration du polymère est identique à celle utilisée pour les autres couches. Selon une caractéristique supplémentaire

de l'invention, dans la couche externe, dans certaines applications, une préparation enzymatique ou une préparation de composants organiques pourra être introduite :

5                   Par exemple (i), une solution de lysozyme additionnée dans la couche externe pour empêcher le développement de bactéries indésirables qui sont sensibles à cette enzyme (exemple connu des bactéries lactiques en vinification) et qui pourraient être à l'origine  
10 d'un trouble difficile à éliminer dans le cas des vins mousseux.

                  Par exemple (ii), les parois de levures qui vont fixer les acides gras, inhibiteurs de l'activité des micro-  
15 -organismes fixés, dans le cas des traitements d'arrêt de fermentation.

                  Selon une autre caractéristique de l'invention les particules ainsi constituées, appelées de sphères triple couche, sont produites dans  
20 une seule étape.

                  La réalisation simultanée de trois couches concentriques peut être faite recourrant à un dispositif de tubes concentriques qui définit deux zones annulaires concentriques autour d'une zone  
25 centrale également concentrique, faisant l'incorporation de la réserve nutritive par le tube central, l'incorporation des micro-organismes et du milieu de fixation, à travers de la zone annulaire définie par la partie externe du tube central et par la partie interne du tube intermédiaire et en faisant l'incorporation de la couche  
30 externe à travers de la zone annulaire définie par la partie externe du tube intermédiaire et par la partie interne du tube externe.

Le diamètre des sphères humides est compris entre 1 et 5 mm. La gélification est faite au moyen du passage d'un agent de réticulation, notamment le chlorure de calcium, sur une solution  
5 selon une procédure déjà connue, et préférentielle, où la réticulation de la sphère est faite de l'extérieur vers l'intérieur. Selon une autre caractéristique de l'invention, ces sphères peuvent être plus ou moins déshydratées jusqu'à une activité de l'eau (AW) finale de 0,1 à 0,5, de préférence de 0,3 à 0,4. Cette déshydratation est réalisée  
10 avec une technique de séchage, à lit fluidisé ou l'utilisation d'étuve. Ces sphères sont conservées dans un emballage résistant à la vapeur et à l'air et de préférence maintenu à une température relativement basse, étant l'idéale 4° C. Dans ces conditions il est possible de conserver le produit plusieurs mois.

15

Les exemples qui suivent illustrent quelques-unes des applications, caractéristiques et avantages de l'invention.

**Exemple 1 :** Préparation de sphères avec triple couche d'alginate, contenant  
20 des levures *Saccharomyces cerevisiae*, immobilisées et au préalable préparées pour résister à un milieu riche en alcool

Les sphères sont préparées à partir d'une solution d'alginate de sodium, polymère linéaire extrait d'algues et composé par l'acide  $\alpha$ -D-manuronique et  $\beta$ -D-guluronique. Les levures, au préalable acclimatées à  
25 l'alcool ou non, sont mélangées avec une partie de cette solution dans une cuve. Pour cet exemple il sera utilisé une souche de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 commercialisée sous la marque Lalvin.



Ensuite et grâce à un dispositif de tubes concentriques, cette solution passe par un système de vibration qui permet la formation de sphères.

Elles sont tout de suite gélifiées lors de la mise en contact avec une  
5 solution 0,2 M de chlorure de calcium, étant le temps de contact d'une demi-heure.

Les sphères ainsi formées sont lavées par immersion pendant 10 minutes dans de l'eau déminéralisée.

10

Ensuite, les sphères sont déshydratées partiellement en lit fluidisé. Ce séchage permet d'obtenir une activité de l'eau (AW) comprise entre 0,3 et 0,4. La température de séchage est inférieure ou égale à 40°C. Le diamètre des sphères qui sont obtenues est de 1,5 à 4 mm. Après le contrôle qualité,  
15 les levures immobilisées et déshydratées sont emballées et stockées à 4°C avant leur utilisation.

#### **Exemple 2: Stabilité des levures pendant le stockage**

20

Afin de valider la préservation de l'activité des sphères, possédant la couche de *Saccharomyces cerevisiae*, suite à une conservation de 6 mois à 4 °C, le contrôle est réalisé de la façon suivante :

- 25 - 30 g de sphères préparées selon l'exemple 1, recouvertes d'une solution de saccharose à 50g<sup>l</sup><sup>-1</sup> (volume 100ml) à 37°C.
- La solution est maintenue à 37°C et l'évolution de la concentration en sucre est à suivre au long du temps.
- Après deux heures, la concentration du sucre est inférieure à 2g<sup>l</sup><sup>-1</sup>,  
30 ce qui correspond à la fin de fermentation.

Ce contrôle de référence est effectué au temps 0 (immédiatement après la production des sphères) et aussi après 6 mois de stockage à 4°C. La fin de la fermentation est effective après le même temps de fermentation de 2 heures. Donc les levures immobilisées préparées selon l'exemple 1, 5 paraissent être stables pendant 6 mois de stockage à 4°C.

## REVENDICATIONS

1 – Procédé d'immobilisation de micro-organismes caractérisé en ce qu'on incorpore dans un milieu de fixation des micro-organismes une réserve nutritive adéquate aux dits micro-organismes et on réalise une réticulation de ce milieu de support.

5

2 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisé en ce qu'on place la réserve nutritive dans la zone la plus éloignée de la frontière externe du milieu de fixation des micro-organismes.

10

3 – Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réserve nutritive est physiquement séparée en zones distinctes, se positionnant dans le milieu de fixation des micro-organismes avec une densité plus grande dans les zones plus distantes de la frontière externe du dit milieu.

15

4 – Procédé selon quelconque des revendications antérieures, caractérisé en ce que la réserve nutritive inclue les éléments nutritifs fournissant, notamment, une source d'azote (ammoniacale ou aminé selon les micro-organismes), sels minéraux (entre autres, phosphates, sulfates, potassium, magnésium) oligo-éléments (entre autres, fer, cuivre, zinc) et vitamines (entre autres, thiamine, biotine).

20

5 – Procédé selon quelconque des revendications antérieures, caractérisé en ce qu'on utilise des sources nutritives complexes comme les extraits de levures autolysées.

25

6 – Procédé selon quelconque des revendications, caractérisé en ce que la réserve nutritive contienne un substrat carboné comme un sucre

fermentable ou encore un milieu de culture complet comme un moût de raisin dilué ou pas.

5           7 – Procédé selon quelconque des revendications antérieures, caractérisé en ce que la réserve nutritive est mélangée à un polymère susceptible de se transformer en gel, notamment l'alginate de sodium.

10           8 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisé en ce que la solution susceptible de se transformer en gel possède une concentration en polymère variant entre 1% et 3%.

15           9 – Procédé selon quelconque des revendications antérieures, caractérisé en ce que la ou les couche(s) contiguë(s) à la réserve nutritive est(sont) constituée(s) d'une solution susceptible de se transformer en gel et des micro-organismes en suspension dans cette solution.

20           10 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisé en ce que la solution susceptible de se transformer en gel a une concentration en polymère variant entre 1% et 50%.

          11 – Procédé selon les revendications 9 et 10, caractérisé en ce que les micro-organismes sont des levures ou des bactéries.

25           12 – Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on utilise des souches de levures sélectionnées de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces uvarum*, lors des fermentations en bouteilles de vins mousseux ou lors de la reprise de fermentation de moûts présentant un ralentissement ou un arrêt de la fermentation alcoolique.

30           13 – Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on utilise des levures du genre *Schizosaccharomyces*, lors de la désacidification des moûts de raisins acides.

14 – Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on utilise des bactéries *Oenococcus oeni* ou *Lactobacillus*, lors de la fermentation malolactique.

5

15 – Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on utilise des levures du genre *Candida*, lors de la bioconversion du xylose en xylitol.

16 – Procédé selon l'une quelconque des revendications antérieures, caractérisé en ce qu'on additionne une couche externe stérile, sans micro-organismes et sans perméabilité pour les micro-organismes existant dans le milieu de fixation, au milieu de fixation des micro-organismes, simultanément ou après l'étape de réticulation de celui-ci.

17 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisé en ce que la couche externe est élaborée à partir d'un polymère d'une nature identique aux couches intérieures et susceptible de se transformer en gel et possédant une concentration identique à celle des autres couches.

18 – Procédé selon les revendications 16 et 17, caractérisé en ce qu'on introduit une préparation enzymatique ou une préparation de composés organiques, dans la couche externe.

19 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisée en ce qu'on additionne une solution de lysozyme à la dite couche externe, empêchant le développement d'espèces indésirables qui sont sensibles à cette enzyme, notamment des bactéries lactiques en vinification.

20 – Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'on additionne à la dite couche externe des parois de levures qui vont fixer les acides gras inhibiteurs de l'activité des micro-organismes fixés, lors du traitement d'arrêt de fermentation.

21 – Produit avec des micro-organismes immobilisés, caractérisé en ce qu'il possède une réserve nutritive incorporée dans le milieu de fixation des micro-organismes.

5

22 – Produit selon la revendication antérieure, caractérisé en ce qu'il possède trois couches, la couche interne étant constituée par la réserve nutritive, la couche intermédiaire étant constituée par les micro-organismes et par le milieu de fixation, et étant la couche externe stérile dépourvue de  
10 micro-organismes et imperméable aux micro-organismes cités.

23 – Procédé selon les revendications 1 à 20, pour la production du produit selon la revendication antérieure, caractérisé en ce que le produit est fait dans une seule étape avec trois couches, en utilisant des tubes  
15 concentriques qui définissent deux zones annulaires concentriques autour d'une zone centrale également concentrique et en réalisant l'incorporation de la réserve nutritive à travers de l'intérieur du tube central, l'incorporation des micro-organismes et du respectif milieu de fixation, à travers de la zone annulaire définie par la partie externe du tube central et par la partie interne  
20 du tube intermédiaire, et en faisant l'incorporation de la couche externe à travers de la zone annulaire définie par la partie externe du tube intermédiaire et par la partie interne du tube externe.

24 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisé en ce  
25 que la réticulation du produit dispensé par le système de tubes est faite par le passage de celui-ci sur une solution d'un agent de réticulation.

25 – Procédé selon la revendication antérieure, caractérisé en ce que le polymère susceptible de se transformer en gel est de nature identique  
30 dans les trois couches du produit et en ce que lorsque celui-ci est un alginat de sodium, l'agent de réticulation est le chlorure de calcium, en se faisant ainsi la réticulation du dit produit exclusivement de l'extérieur vers l'intérieur.

26 – Procédé selon quelconque des revendications 23 à 25, caractérisé en ce que le produit dispensé par le dispositif de tubes concentriques est coupé par un dispositif de vibration, formant ainsi des sphères.

5

27 – Procédé selon quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce qu'ensuite le produit subit une déshydratation partielle jusqu'à une AW finale de 0,1 à 0,5, de préférence de 0,3 à 0,4, notamment en utilisant une technique de séchage, à lit fluidisé ou l'utilisation d'étuves.

10

28 – Produit selon la revendication 22, produit selon le procédé de la revendication 26, caractérisé en ce qu'il possède une forme sphérique et trois couches.

15

29 – Produit selon la revendication antérieure, caractérisée en ce que le diamètre externe des sphères humides est compris entre 1 mm et 5 mm.

20

30 – Utilisation caractérisée par l'emploi du produit de quelconque des revendications 21 à 22 ou 28 à 29, pour la fermentation de boissons en bouteille.

25

31 – Utilisation caractérisée par l'emploi du produit de quelconque des revendications 21 à 22 ou 28 à 29, pour la reprise de fermentation de moûts présentant un ralentissement ou un arrêt de la fermentation alcoolique.

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/IB 03/01753

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N11/04 C12G1/022 C12G1/073 C12C11/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 519 022 A (RHONE POULENC SA) 1 July 1983 (1983-07-01) page 2, line 31 - line 37 page 6, line 34 - page 7, line 13 page 8, line 22 - line 25 page 10, line 1 - page 13, line 8	1,4-8, 10,22
X	EP 0 578 617 A (SIAPA SPA) 12 January 1994 (1994-01-12) page 2, line 23 - line 40	1,4-8, 10,22
X	EP 0 350 374 A (MOET & CHANDON) 10 January 1990 (1990-01-10) cited in the application  examples 1-4	1,4-8, 10-13, 16,21, 30,31

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 September 2003

Date of mailing of the international search report

29/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou, G



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCI/IB 03/01753

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 812 655 A (LALLEMAND SA) 8 February 2002 (2002-02-08) examples 1,2 ----	
A	YOKOTSUKA K ET AL: "CONTROLLED SIMULTANEOUS DEACIDIFICATION AND ALCOHOL FERMENTATION OF A HIGH-ACID GRAPE MUST USING TWO IMMOBILIZED YEASTS, SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE" AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE, XX, XX, vol. 44, no. 4, 1993, pages 371-377, XP000956002 ISSN: 0002-9254 the whole document ----	
A	WO 92 14544 A (MOET & CHANDON) 3 September 1992 (1992-09-03) page 10, line 1 - line 28; example 3 ----	
A	DIVIES CHARLES ET AL: "Theme 4: Immobilized cell technology in wine production." CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 14, no. 2, 1994, pages 135-153, XP009017645 ISSN: 0738-8551 the whole document -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 03/01753

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2519022	A	01-07-1983	FR 2519022 A1	01-07-1983
			AU 560455 B2	09-04-1987
			AU 9193582 A	07-07-1983
			BR 8207547 A	25-10-1983
			CA 1179616 A1	18-12-1984
			DE 3263700 D1	13-06-1985
			EP 0083267 A1	06-07-1983
			ES 8308925 A1	16-12-1983
			OA 7289 A	31-08-1984
			US 4755468 A	05-07-1988
EP 0578617	A	12-01-1994	IT 1258418 B	26-02-1996
			EP 0578617 A2	12-01-1994
EP 0350374	A	10-01-1990	FR 2633937 A1	12-01-1990
			AT 66689 T	15-09-1991
			AU 641360 B2	23-09-1993
			AU 3961289 A	05-02-1990
			DE 68900229 D1	02-10-1991
			DK 1791 A	06-03-1991
			EP 0350374 A1	10-01-1990
			WO 9000602 A1	25-01-1990
			US 5389532 A	14-02-1995
			US 5627062 A	06-05-1997
			US 5627063 A	06-05-1997
FR 2812655	A	08-02-2002	FR 2812655 A1	08-02-2002
			AU 8226001 A	18-02-2002
			WO 0212473 A2	14-02-2002
WO 9214544	A	03-09-1992	FR 2673122 A1	28-08-1992
			AU 642815 B2	28-10-1993
			AU 1423092 A	15-09-1992
			CA 2081314 A1	26-08-1992
			DE 69221895 D1	02-10-1997
			EP 0637264 A1	08-02-1995
			ES 2109349 T3	16-01-1998
			WO 9214544 A1	03-09-1992
			PT 100157 A ,B	31-05-1993
			US 5567451 A	22-10-1996
			US 5385741 A	31-01-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dei Internationale No  
PCT/IB 03/01753

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N11/04 C12G1/022 C12G1/073 C12C11/09

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12G

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 519 022 A (RHONE POULENC SA) 1 juillet 1983 (1983-07-01) page 2, ligne 31 - ligne 37 page 6, ligne 34 -page 7, ligne 13 page 8, ligne 22 - ligne 25 page 10, ligne 1 -page 13, ligne 8	1,4-8, 10,22
X	EP 0 578 617 A (SIAPA SPA) 12 janvier 1994 (1994-01-12) page 2, ligne 23 - ligne 40	1,4-8, 10,22
X	EP 0 350 374 A (MOET & CHANDON) 10 janvier 1990 (1990-01-10) cité dans la demande  exemples 1-4	1,4-8, 10-13, 16,21, 30,31
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 septembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/09/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Loubradou, G

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 812 655 A (LALLEMAND SA) 8 février 2002 (2002-02-08) exemples 1,2 ----	
A	YOKOTSUKA K ET AL: "CONTROLLED SIMULTANEOUS DEACIDIFICATION AND ALCOHOL FERMENTATION OF A HIGH-ACID GRAPE MUST USING TWO IMMOBILIZED YEASTS, SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE" AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE, XX, XX, vol. 44, no. 4, 1993, pages 371-377, XP000956002 ISSN: 0002-9254 le document en entier ----	
A	WO 92 14544 A (MOET & CHANDON) 3 septembre 1992 (1992-09-03) page 10, ligne 1 - ligne 28; exemple 3 ----	
A	DIVIES CHARLES ET AL: "Theme 4: Immobilized cell technology in wine production." CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 14, no. 2, 1994, pages 135-153, XP009017645 ISSN: 0738-8551 le document en entier -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

De l'Organisation Internationale No

PCT/IB 03/01753

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2519022	A	01-07-1983	FR 2519022 A1	01-07-1983
			AU 560455 B2	09-04-1987
			AU 9193582 A	07-07-1983
			BR 8207547 A	25-10-1983
			CA 1179616 A1	18-12-1984
			DE 3263700 D1	13-06-1985
			EP 0083267 A1	06-07-1983
			ES 8308925 A1	16-12-1983
			OA 7289 A	31-08-1984
			US 4755468 A	05-07-1988
EP 0578617	A	12-01-1994	IT 1258418 B	26-02-1996
			EP 0578617 A2	12-01-1994
EP 0350374	A	10-01-1990	FR 2633937 A1	12-01-1990
			AT 66689 T	15-09-1991
			AU 641360 B2	23-09-1993
			AU 3961289 A	05-02-1990
			DE 68900229 D1	02-10-1991
			DK 1791 A	06-03-1991
			EP 0350374 A1	10-01-1990
			WO 9000602 A1	25-01-1990
			US 5389532 A	14-02-1995
			US 5627062 A	06-05-1997
			US 5627063 A	06-05-1997
FR 2812655	A	08-02-2002	FR 2812655 A1	08-02-2002
			AU 8226001 A	18-02-2002
			WO 0212473 A2	14-02-2002
WO 9214544	A	03-09-1992	FR 2673122 A1	28-08-1992
			AU 642815 B2	28-10-1993
			AU 1423092 A	15-09-1992
			CA 2081314 A1	26-08-1992
			DE 69221895 D1	02-10-1997
			EP 0637264 A1	08-02-1995
			ES 2109349 T3	16-01-1998
			WO 9214544 A1	03-09-1992
			PT 100157 A ,B	31-05-1993
			US 5567451 A	22-10-1996
			US 5385741 A	31-01-1995